

红曲霉葡萄糖淀粉酶肽段 P_A 的提纯及性质的研究

李 钦 王永祥 张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京)

红曲霉葡萄糖淀粉酶能水解淀粉产生葡萄糖。我们已对它进行了提纯、结晶^[1,2], 及电子显微镜观察^[3,4], 并测定了它的一些基本性质^[5,6]。该酶的两个主要分子型 E₃ 和 E₄ 的肽图谱绝大部分是相同的, 只有个别肽段不同^[7]。我们用胰凝乳蛋白酶水解红曲霉葡萄糖淀粉酶的两个型, 两者的产物中都有一个 P_A 肽段, 其凝胶电泳迁移率和纸层析 R_f 值相同。本文报道我们用垂直板型凝胶制备电泳及凝胶层析法提纯 P_A 肽段, 并对其性质进行的研究结果。

一、材料与方法

1. 酶制剂

红曲糖化酶(无锡酶制剂厂), 生产菌种为红曲霉 (*Monascus rubiginosus sato*) AS3.3491, 酶活力为 20,000 单位/克。

2. 化学试剂

结晶胰凝乳蛋白酶(上海东风生化试剂厂)。Sephadex G-25 和 G-50 (中) (Pharmacia 公司产)。十二烷基硫酸钠 (SDS) (BDH 产品)。所用已知分子量蛋白质有胰岛素(上海生化所产品), 大豆胰蛋白酶抑制剂 (Boehringer 产品)、胃蛋白酶(上海东风生化试剂厂), 卵清白蛋白 (E. Merck 产品), 烟草花叶病毒和苜蓿花叶病毒的外壳蛋白 (AMV 和 TMV, 本所蔡发兴提供), 细胞色素 c (天津生物化学制药厂)。载体两性电解质 Ampholine pH3-10 (LKB 公司)。

3. 分析方法

蛋白质测定用 Lowry 法^[8]。高压电泳用 shandon 公司生产的高压电泳仪 (0—10,000 伏)。凝胶层析用流动式紫外光吸收计 (uvicord II, LKB 产品)。凝胶电泳按 Davis^[9] 方法。

样品水解参照 Blackburn 的方法^[12], 用 Hitachi 835 型氨基酸自动分析仪测定*。

二、实验结果

1. 酶水解

用垂直板型凝胶制备电泳制得红曲霉葡萄糖淀粉酶的 E₃ 和 E₄ 纯品, 透析去盐, 并浓缩至 2—5 mg/ml^[12]。另将红曲霉葡萄糖淀粉酶酶制剂经浸出、硫酸铵分级沉淀和 sephadex G-25 凝胶层析脱盐, 得到硫酸铵沉淀^[1], 其中包括 E₃、E₄ 和 E₅ 三个成分, 统称之为 E_m。

分别取一定量 E₃ 和 E₄ 或 E_m, 加入 pH7.8 0.2M 磷酸缓冲液, 使样品含缓冲液浓度为 0.02M, 在沸水浴中将样品煮 2 分钟, 冷却后加入胰凝乳蛋白酶, 底物与酶之比为 50:1, 在 37℃ 水浴中保温 24 小时进行酶解。然后在沸水浴上加热 5 分钟, 以终止酶反应。将酶解液离心, 取上清液透析, 供分肽用。

2. 肽段 P_A 的提纯

用胰凝乳蛋白酶水解的 E₃、E₄ 和 E_m 的凝胶电泳图谱 (图 1) 都有一个相对迁移率 (R_m) 是 0.81 的区带。这是三者水解后均有的一个肽段, 暂称 P_A。再用垂直板型凝胶制备电泳方法将其切下, 得到了凝胶电泳均一的肽段 P_A (图 1D)。每块平板加胰凝乳蛋白酶水解的 E_m 70mg, 可得到纯品肽段 P_A 2—3mg。用纸层析法鉴定它也是均一的 (图 2)。

因板电泳制备得率低, 我们又采用 sephadex G-50 (中) 凝胶层析法。上柱样品为胰凝乳蛋白酶水解的 E_m 约 30mg, 用流动式紫外光吸收计和自动记录仪记录流出峰, 再根据凝胶电泳

* 生物物理所中心实验室贺宝珍协助测定。

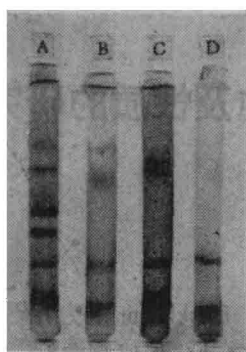


图1 用胰凝乳蛋白酶水解的红曲霉葡萄糖淀粉酶 E_3 、 E_4 和 E_m 及肽段的凝胶电泳图谱

A: E_m , B: E_3 , C: E_4 , D: 提纯的肽段 P_A , 凝胶浓度 10%, 0.1% 考马斯亮蓝 R-250 染色

合并第 28—34 管, 每根柱每次可得纯 P_A 2—3mg。图 3 和 4 分别是用柱提纯 P_A 的凝胶层析洗脱图谱、凝胶电泳图和纸层析图谱。从凝胶电泳图上得到的相对迁移率 (R_m) 值为 0.82, 与平板电泳提纯的 P_A 相同, 该肽段在纸层析上也是均一的一个点。

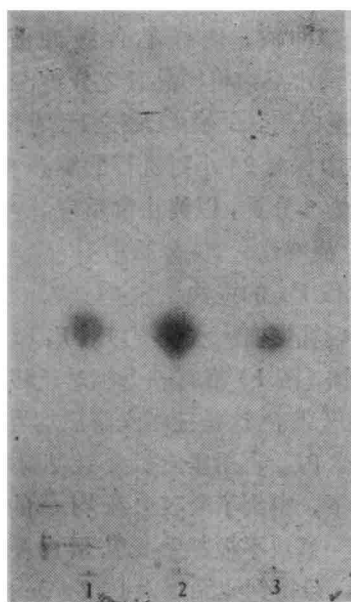


图2 用胰凝乳蛋白酶水解的 E_3 、 E_4 和肽段 P_A 的纸层析图谱

1: E_3 , 2: E_4 , 3: 用垂直板型凝胶电泳法提纯的肽段 P_A , 层析溶剂为异戊醇: 吡啶: 水 = 35:35:30, 在 25℃ 上行展开 20 小时, 1% 茚三酮的丙酮溶液显色

3. 肽段 P_A 的性质

(1) 分子量 用三种方法测定凝胶层析提

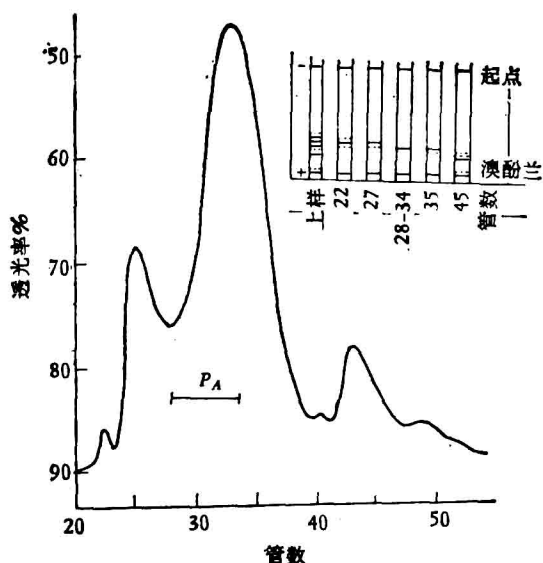


图3 Sephadex G-50(中)凝胶层析洗脱图谱

柱长 100 厘米, 内径 1.5 厘米, 流速 9ml/h, 30 分钟收集一管纯的肽段 P_A 的分子量。a: 阻留商法, 基本按 Zwann^[10] 方法, 凝胶浓度分别为 8% 和 14%。用此法测得 P_A 的分子量为 7,500 (图 5)。b: SDS-凝胶电泳法^[11], 凝胶浓度 15%, 测得 P_A 分子量为 10,000 (图 6)。c: 凝胶层析法, 按提纯 P_A 时的层析条件, 测得 P_A 的分子量为 10,000 (图 7)。

(2) 紫外吸收光谱 用 SP-700 型紫外分光光度计, 自动记录不同波数的透光率, 结果见图 8。样品为板型凝胶电泳制备的肽段 P_A , 浓度 0.5 mg/ml。肽段 P_A 水溶液的最高与最低吸收值分别是 284nm 和 262nm。由板型凝胶电泳制备并且经过透析, 未酶解的红曲霉葡萄糖淀粉酶测得 E_4 最高吸收值在 282nm, 最低吸收值在 252nm。后者与文献[5]报道一致。

(3) 氨基酸组成用冷冻干燥的肽段 P_A 样品 0.5 毫克 (板型凝胶电泳制备), 加入 0.5ml 6N 盐酸和 0.1ml 4% 巯基乙酸, 于样品中通高纯氮气 5 分钟, 赶掉空气, 立即封管; 在 105—110℃ 水解 24 小时, 真空减压去掉盐酸后溶于 3ml pH 2.2 柠檬酸缓冲液中, 测定氨基酸含量。按照 Thornber 和 Olson 法^[13] 计算, 结果见表 1。肽段 P_A 中含有 63 个氨基酸残基, 据此计算的分子量为 6,572。测定中因有巯基乙

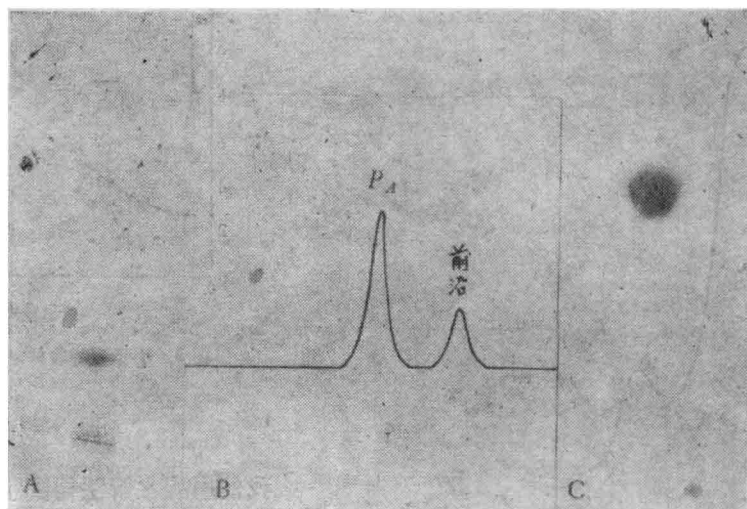


图4 用Sephadex G-50 (中)凝胶层析法提纯的 P_A 凝胶电泳图和纸层析图谱

A: P_A 的凝胶电泳图谱、凝胶浓度 10%, 0.1% 考马斯亮兰 R-250 染色。B: 图中 A 的光密度扫描图 C: P_A 的纸层析图谱, 层析条件同图 2

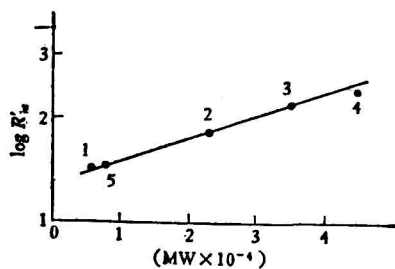


图5 用阻留商法测分子量

1. 胰岛素 (M. W. 6,000), (2) 大豆胰蛋白酶抑制剂 (M. W. 22,000), 3. 胃蛋白酶 (M. W. 35,000), 4 卵清白蛋白 (M. W. 43,000), 5. 肽段 P_A (M. W. 7,500)

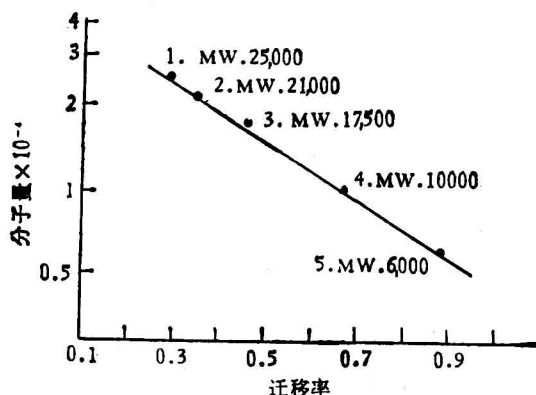


图6 SDS-凝胶电泳方法测定分子量

1: AMV 外壳蛋白 2: 大豆胰蛋白酶抑制剂, 3: TMV 外壳蛋白 4: 肽段 P_A 5: 胰岛素

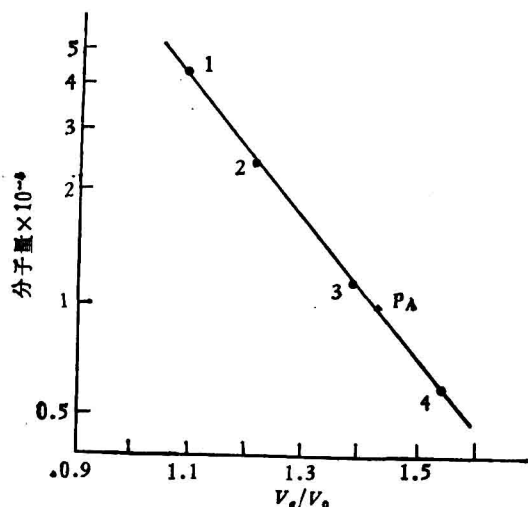


图7 凝胶层析法测定蛋白质 V_e/V_0 与分子量 (对数) 的关系

1. 卵清白蛋白 (M. W. 43,000) 2. 胰凝乳蛋白酶 (M. W. 24,000) 3. 细胞色素 c (M. W. 11,700) 4. 胰岛素 (M. W. 6,000) 5. 肽段 P_A (M. W. 10,000)

酸的保护, 可直接得到色氨酸含量。标准色氨酸同样水解, 收率为 60—80%, 与文献^[12]一致。

(4) 等电点 用小管型凝胶等电聚焦法^[14]测定, 玻璃管内径 0.5cm, 凝胶长 8cm, 凝胶浓度为 7%, 含 pH3—10 载体两性电解质 1%, 样品混在凝胶中聚合, 每个凝胶管含肽段 P_A 为

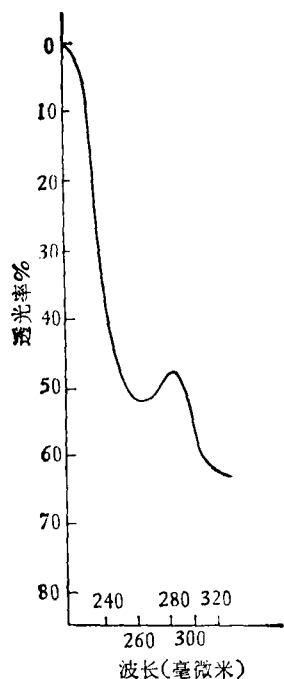


图8 肽段 P_A 的紫外吸收光谱

表1 肽段 P_A 的氨基酸组成

氨基酸	每分子中氨基酸残基数
天冬氨酸	7
苏氨酸	4
丝氨酸	6
谷氨酸	6
甘氨酸	9
丙氨酸	5
胱氨酸	4
缬氨酸	3
甲硫氨酸	1
异亮氨酸	2
亮氨酸	4
酪氨酸	2
苯丙氨酸	2
赖氨酸	1
组氨酸	1
色氨酸	1
精氨酸	2
脯氨酸	3
共 计	63

100 μ g。电泳时恒流 2mA, 350V, 15—20 $^{\circ}$ C, 3 小时。根据染色区带的位置和所测 pH 梯度曲线查出肽段 P_A 的等电点 pI 为 4.0 (图 9)。

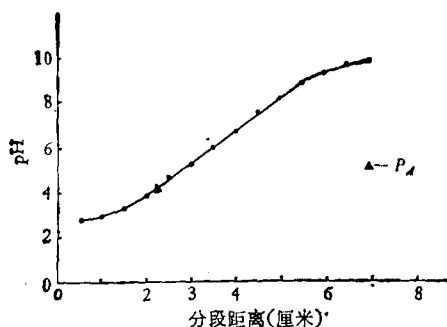


图9 小管型凝胶等电聚焦 pH 梯度

讨 论

我们用酶水解法得到了肽段 P_A, 这个肽段在该酶的几个型中都是相同的, 所以可从几个型的混合样品中分离得到。

采用三种方法测得肽段 P_A 的分子量, 分别为 7,500, 10,000 和 10,000, 均较以氨基酸残基数计算的分子量 6,572 为高。产生误差的原因是由于这些方法一般适用于测定较大分子量的球状分子, 而较不适于低分子量的肽段分子量的测定。有人报道误差甚至可高达 20% 以上^[15]。另外, 经初步分析, 肽段 P_A 中含糖量 15%, 如果加上, 分子量约 7,700 左右。与 7,500 还是接近的。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物研究所酶结构与功能研究组: 《微生物学报》, **16**, 200, 1976。
- [2] 中国科学院微生物研究所酶结构与功能研究组: 《生物化学与生物物理进展》, **4**, 36, 1976。
- [3] 中国科学院微生物研究所酶结构与功能研究组: 《生物化学与生物物理学报》, **10**, 349, 1978。
- [4] 李钦、张树政等: 《科学通报》, **26**(13), 811, 1981。
- [5] 中国科学院微生物研究所酶结构与功能研究组: 《微生物学报》, **17**(2), 101, 1977。
- [6] 中国科学院微生物研究所酶结构与功能研究组: 《微生物学报》, **20**(3), 263, 1980。
- [7] 李钦、张树政: 《微生物学报》, 待发表。
- [8] Lawry O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951。
- [9] Davis, B. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404, 1964。
- [10] Zwaan, J.: *Anal. Biochem.*, **21**, 155, 1967。
- [11] Weber, K. et al.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406, 1969。
- [12] Blackburn, S.: *Amino Acid Determination, methods and techniques*, Marcel Dekker, INC. New York and Basel. 9, 1978。
- [13] Thornber, J. P. et al.: *Biochemistry*, **7**, 2242。

1968.

[14] 乔克强等:《聚丙烯酰胺凝胶电泳》,科学出版社,81,1975。

[15] Strauss, E. G. et al.: *Virology*, 42, 437, 1970.

[本文于1983年7月7日收到]

刀豆球蛋白 A 亲和双向免疫电泳对人体 α_1 -抗胰蛋白酶分子变异体的研究

关赛芳 徐世康 陈复华

(上海市肿瘤研究所)

α_1 -抗胰蛋白酶(AAT)是一种低分子量的血清糖蛋白,属于丝氨酸蛋白酶类的蛋白酶抑制剂。由于某些 AAT 遗传的分子变异体与肺退行性疾病、肝硬化、肝癌及其它炎症性疾病有关,因而受到人们的重视^[1]。现已发现 AAT 含有 40 多个等位基因^[2],因而所表达的基因产物往往是抗原性一致而分子构型不同的各种蛋白质分子。Fagerhol^[2] 等曾用酸性淀粉凝胶电泳, Teppsson^[3] 等曾用等电聚焦分离 AAT 不同基因表达的蛋白质变异体。近年来人们根据外源凝集素(Lectin)和糖蛋白相互作用不同,用它区分各种糖蛋白分子变异体。我们利用刀豆球蛋白 A(ConA)具有能与糖蛋白中某些糖基专一性结合的特点,建立了一种简便敏感的 ConA 亲和双向免疫电泳(Aff-DIEP)方法,分离血清 AAT 变异体,并初步观察正常人、肝、肺等疾病 AAT 分子变异体的变化,为临床诊断提供依据。

一、材料与方 法

1. AAT 血清 正常人血清(上海市中心血站供给),肝癌、肺癌、卵巢癌患者血清(上海第一医学院肿瘤医院提供),肝炎血清(闸北区传染病医院提供)。

2. 试剂 刀豆球蛋白 A(pharmacia 产品)。琼脂糖(BDH 产品 $M_r = 100,000$)。抗人 AAT 抗血清(自制)。用 ConA-Sepharose 4B 亲和柱层析分离人血清获得纯 AAT,经蛋白电泳及免疫电泳证实为免疫纯。再以纯化的

AAT 制备羊抗人 AAT 抗血清。

3. ConA 亲和双向免疫电泳 根据 Bøgg-Hansen^[4] 等方法进行 α_1 -抗胰蛋白酶分子变异体亲和免疫电泳。用电泳缓冲液(73mM Tris-24.5mM 巴比妥缓冲液, pH8.6)配制成 1% Agarose 5.5ml, 内含 1mM $MgCl_2$ 和 1mM $CaCl_2$ 及 ConA 2.8mg, 混合注入 4.5×7 cm 的玻璃片上,使其含 ConA $90 \mu g/cm^2$, 凝胶厚 2mm, 距阴极 1cm 玻片处打 6 个孔,每个孔分别加入 $2 \mu l$ 人血清作第一向电泳。电泳条件为 4V/cm, 2 小时, $25^\circ C$ 。电泳完毕后,将样品凝胶条移至 7×14 cm 大玻板一侧,并将含有 1.5% 的抗人 AAT 抗体的 1% 琼脂糖铺入玻板,冷却后走第二向电泳,条件为 2V/cm, 8 小时。AAT 总量用火箭免疫电泳测定。

二、结果与讨论

1. 刀豆球蛋白 A 亲和双向免疫电泳特性

采用双向免疫电泳时,通常含有某种蛋白质抗体的样品经第一向电泳后,再作第二向电泳,一种蛋白质仅呈现单一免疫沉淀峰。如果在第一向中加入一定量的凝集素,则糖蛋白中糖基与凝集素相互结合,从而部分地或完全地延缓了不同分子形式的糖蛋白泳动速度,于是含有不均匀性糖链的糖蛋白分子被区分开来。我们正是用这种方法分离 AAT 分子变异体的。

实验结果表明 AAT 分子变异体的数目是随第一向凝胶中加入 ConA 的量不同而变化。